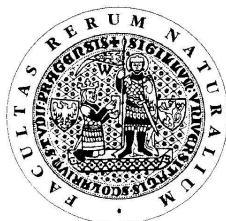


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Iva Mácová

Slepičí protilátky jako nástroj imunodetekce  
cytochromů P450

Chicken antibodies as a tool of cytochrome P450  
immunodetection

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Petr Hodek CSc.

Praha 2011

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. května 2011.

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za cenné rady a připomínky při tvoření této práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům za vytvoření vynikajícího pracovního prostředí. Zejména bych chtěla poděkovat RNDr. Michaelle Moserové a RNDr. Jitce Křížkové, Ph. D. za pomoc při experimentální části.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině a přátelům, kteří mě podporovali během mého celého studia.

## Abstrakt

Cytochrom P450 je významný enzym katalyzující velké množství reakcí metabolismu endogenních i exogenních látek. Existují látky, které zvyšují expresi tohoto enzymu, což může vést k aktivaci karcinogenů a vzniku rakoviny. Mezi tyto látky patří i dnes velmi propagované chemopreventivní látky, které jsou masově užívané ve formě potravinových doplňků. Je tedy důležité mít k dispozici metody k určení indukce cytochromu P450. Jednou z takových metod je imunodetekce cytochromu P450 metodou Western blotting. K detekci proteinů na membráně slouží specifické protilátky získané většinou ze savců. V této bakalářské práci je dokázáno, že stejně dobře však mohou posloužit i protilátky získané ze slepičích vajec. Těmito vaječnými protilátkami byly detekovány cytochromy P450 1A1 a 1A2 v jaterních mikrosomech po expozici potkanů modelové chemopreventivní látce  $\beta$ -naftoflavonu.

**Klíčová slova:** cytochrom P450, indukce, imunodetekce, chemoprevence, karcinogenese

## Abstract

Cytochrome P450 is an important enzyme which catalyzes a large amount of reactions of endogenous and exogenous metabolism. There are compounds which increase expression of this enzyme and it leads up to the carcinogen activation and cancer formation. It includes much propagated chemopreventive compounds which are consumed abundantly in dietary supplements. It is therefore important to have the methods for determination of cytochrome P450 induction. One of these methods is the cytochrome P450 immunodetection by Western blotting. The detection of proteins on the membrane is done by the specific antibodies mostly gained from mammals. In this bachelor thesis there is the evidence that the antibodies from hen egg serve as well as the mammalian antibodies. The cytochromes P450 1A1 and 1A2 was detected by these egg antibodies after rat exposure to the model chemopreventive compounds  $\beta$ -naphthoflavone.

**Key words:** cytochrome P450, induction, immunodetection, chemoprevention, carcinogenesis

# **Obsah**

<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>7</b>
<b>1 Teoretický úvod.....</b>	<b>9</b>
1.1 Metabolismus xenobiotik.....	9
1.2 Cytochrom P450 .....	10
1.2.1 Struktura cytochromu P450 .....	11
1.2.2 Nomenklatura cytochromu P450 .....	11
1.2.3 Katalytická funkce cytochromu P450.....	11
1.2.4 Inhibice a indukce cytochromu P450.....	12
1.3 Chemoprevence rakoviny .....	15
1.3.1 Chemoprevence a cytochrom P450 .....	16
1.4 Protilátky.....	18
1.4.1 Slepičí protilátky.....	19
1.4.2 Struktura IgY .....	19
1.4.3 Výhody slepičích protilátek .....	20
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>22</b>
<b>3 Materiál a metody .....</b>	<b>23</b>
3.1 Použitý materiál .....	23
3.2 Použité pomůcky a nástroje .....	25
3.3 Použité metody.....	27
3.3.1 Indukce potkanů.....	27
3.3.2 Izolace mikrosomů.....	27
3.3.3 Stanovení proteinů .....	28
3.3.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu.....	29
3.3.5 Western blotting.....	31

3.3.6	Optimalizace metody .....	33
3.3.7	Dialýza keratinu .....	33
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>42</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>43</b>

## Seznam použitých zkratk

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky
BaP	benzo[a]pyren
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP/NTB	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CAR	receptor pro konstitutivní adrostan
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fab	antigen vázající fragment
Fc	krystalizovatelný fragment
g	tíhové zrychlení [9,8 m/s <sup>2</sup> ]
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	Human Immunodeficiency Virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
Ig	imunoglobulin
IgG	savčí imunoglobulin typu G
IgY	slepičí imunoglobulin typu Y
kDa	kilodalton
MQ voda	deionizovaná voda z přístroje Simplicity 185, Millipore corp.
NADPH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
PAGE	elektroforéza v polyakrylovém gelu
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr
PCB	polychlorované bifenyly

PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	receptor pro pregnan X
RIA	Radioimmunoassay
RPM	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
TCDD	2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	uridindifosfát



# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Metabolismus xenobiotik

Lidský organismus se během svého života setkává s velkým množstvím látek, které se běžně v jeho těle nevyskytují a ani je nepotřebuje ke svému růstu, vývoji či jako zdroj energie. Tyto látky se definují jako xenobiotika.<sup>1</sup> Do této skupiny se řadí např. léky, polutanty, přídatné látky v potravinách či chemické sloučeniny používané v zemědělství (pesticidy, herbicidy atd.). Xenobiotika mohou být pro organismus škodlivé, a proto se je tělo snaží odbourat pomocí metabolismu, probíhající především v jaterních buňkách.

Metabolismus xenobiotik se skládá většinou ze dvou fází. Během první fáze se cizorodá látka přeměňuje na více polární metabolit a to hlavně reakcemi oxidačními (oxidace, epoxidace, O-dealkylace, N-dealkylace, N-oxidace, S-oxidace, oxidační desulfurace, oxidační deaminace) a méně reakcemi redukčními a hydrolytickými. V druhé fázi potom reaguje funkční skupina metabolitu vytvořeného během první fáze s endogenním substrátem (kyselina glukuronová, kyselina sírová, kyselina octová, cystein, glutathion) za vzniku konjugátu, který je ve většině případů méně toxický než metabolit i původní xenobiotikum.<sup>2</sup> Vzniklý konjugát se vrací do krevního oběhu, odkud může být posléze vyloučen močí, stolicí, potem či vydechaným vzduchem.<sup>1</sup> Biotransformace xenobiotik je tudíž rychlý a účinný nástroj na odstranění potenciálních škodlivin z organismu.

Na metabolismu se podílí mnoho enzymů. Mezi enzymy první fáze se řadí hlavně oxidoreduktázy jako cytochrom P450, flavinové monooxygenasy, monoaminoxidasy, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasy, aldehydoxidasy a xanthinoxidasa. Během druhé fáze se nejvíce uplatňují enzymy ze třídy transferas - UDP-glukonosyltransferasa, sulfotransferasy, N-acetyltransferasa, methyltransferasy a glutathion-S-transferasa.<sup>1</sup>

## 1.2 Cytochrom P450

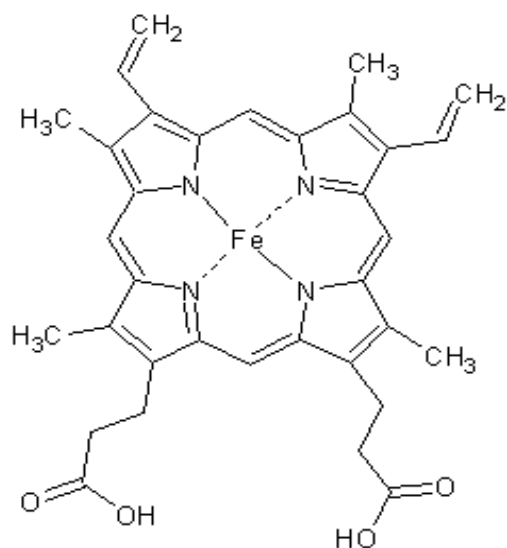
Cytochrom P450 je monooxygenasa se smíšenou funkcí, která hraje významnou roli v první fázi metabolismu xenobiotik. Toto ale není jeho jediná funkce, neboť se účastní i metabolismu a syntézy některých endogenních látek – steroidy, žlučové kyseliny, cholesterol, arachidonová kyselina a eikosanoidy.<sup>3</sup> Nejvíce se vyskytuje v membránách hladkého endoplazmatického retikula a mitochondrií.

Výskyt cytochromu P450 byl potvrzen téměř u všech organismů od plísní a bakterií přes rostliny až k člověku. Což vede k teorii, že se během let z jednoho jediného genu archebakterií, který existoval před více než 1,5 miliardami let, vyvíjelo mnoho různých genů kódujících různé izoformy cytochromu P450.<sup>4</sup> U člověka je známo asi 53 genů CYP, ve srovnání např. s bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, která jich má kolem 20 nebo rostlinou Huseníčkem polním (*Arabidopsis thaliana*) mající dokonce 286 takových genů, ale naopak bakterie *Escherichia coli* neobsahuje žádný gen, kodující cytochrom P450. Velké množství cytochromu P450 u rostlin je vysvětlováno syntézou velkého množství sloučenin potřebných na zbarvení květů, listů apod. nebo k obraně.<sup>5</sup>

Cytochrom P450 objevili Klingenberg a Garfinkel<sup>6,7</sup> v roce 1958 pozorováním spektra jaterních mikrosomů. Dospěli k závěru, že po redukci mikrosomů redukovaným difosfopyridinovým nukleotidem či disiřičitanem a po navázání oxidu uhelnatého se objeví absorpční pás při vlnové délce 450 nm. Avšak v té době nebylo dokázáno, jaká látka je za tyto vlastnosti odpovědná. Nicméně podle této pozice absorpčního maxima ve spektru dostal cytochrom P450 později jméno. V roce 1964 Sato a Omura objasnili, že se jedná o nový hemoprotein.<sup>8</sup> V 60. a 70. letech byl již tento enzym spojován s hydroxylací mastných kyselin a léků.<sup>9, 10</sup> Klonování cDNA objevené v 80. letech umožnilo objasnit celou strukturu cytochromu P450.<sup>3</sup>

### 1.2.1 Struktura cytochromu P450

Cytochrom P450 patří do skupiny hemoproteinů. Skládá se z apoproteinu a hemu typu b, což je stejný hem jako např. u hemoglobinu a myoglobinu.<sup>11</sup> Hem b (viz Obrázek 1) obsahuje protoporfyrin IX s centrálním atomem železa, který je připojen přes čtyři atomy dusíku pyrolů. Apoprotein je na hem b vázán přes thiolátovou síru cysteinového zbytku.<sup>12</sup>



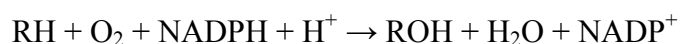
Obrázek 1: Struktura hemu b

### 1.2.2 Nomenklatura cytochromu P450

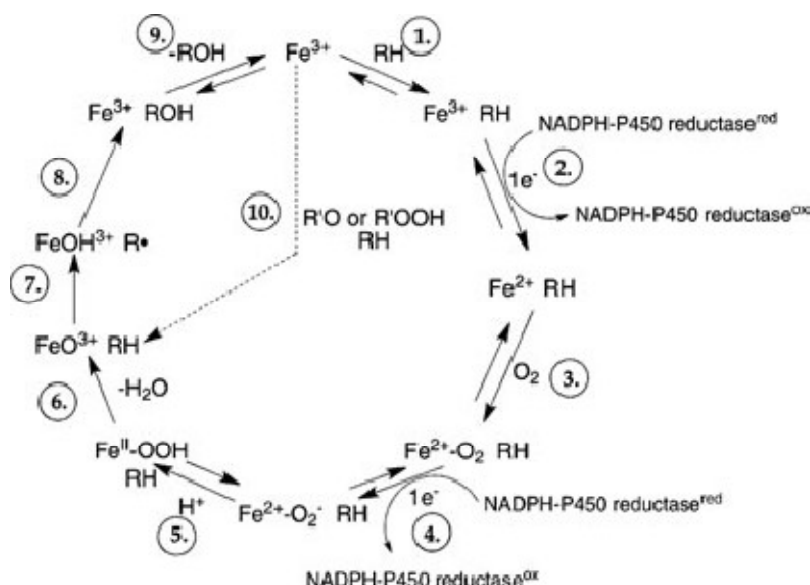
Vzhledem k velkému množství forem cytochromu P450 bylo zavedeno dělení na rodiny a podrodiny podle procenta identity v sekvenci aminokyselin apoproteinu.<sup>13</sup> Pokud mají cytochromy P450 primární strukturu shodnou z  $\geq 40\%$ , patří do stejné rodiny. Ty se označují arabskými číslicemi. Jestliže je sekvence aminokyselin identická z  $\geq 55\%$ , spadají tyto enzymy do společné podrodiny označující se velkým latinským písmenem. Konkrétní forma enzymu se značí opět číslicí. Databázi cytochromu P450 lze nalézt na internetové stránce P450 Gene Superfamily Nomenclature Committee.<sup>14</sup>

### 1.2.3 Katalytická funkce cytochromu P450

Nejčastěji cytochrom P450 katalyzuje oxidace, kdy přenáší z molekulárního kyslíku jeden atom na substrát a z druhého vzniká voda. Sumárně lze tuto oxidaci substrátu vyjádřit takto:



Obecně přijímaná teorie, jak mikrosomální cytochrom P450 funguje, se dá zjednodušeně popsat katalytickým cyklem na Obrázku 2.



Obrázek 2: Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z <sup>15</sup>)

Na trojmocný atom železa cytochromu P450 se v distální rovině naváže substrát (1). Po tomto kroku se může, ale také nemusí změnit spin železa a usnadnit následující krok (2), během něhož se přenáší na železo elektron z NADPH pomocí flavoproteinu NADPH:P450 reduktasy. Poté se na komplex váže  $O_2$  (3). V dalším kroku (4) se přeneseme druhý elektron buď stejnou cestou jako během druhého kroku, nebo ještě přes cytochrom  $b_5$ . Následuje přijetí protonu  $H^+$  (5) a rozštěpení vazby  $O_2$  za odštěpení  $H_2O$  (6). Tím se stane komplex velmi nestabilní a elektrofilní, proto vytrhne ze substrátu elektron (7). V osmém kroku se OH skupina převede na substrát a nakonec se oxidovaný substrát uvolní z cytochromu P450 (9).<sup>5, 15</sup>

Cytochrom P450 je schopen oxidovat substráty i bez přítomnosti NADPH:P450 reduktasy a  $O_2$ . Tento případ nastává, kdy jako donor elektronů a kyslíku vystupuje peroxid. Tím se cyklus značně zrychluje a přeskočí se několik kroků (10).

Toto však nejsou jediné možné principy reakcí katalyzovaných cytochromy P450. Tento enzym totiž dokáže katalyzovat i redukce, dehydrogenace, tvorbu či rozšiřování kruhů, štěpení aldehydů, oxidace pomocí pouze jednoho elektronu, dehydratace a další.<sup>5</sup>

#### 1.2.4 Inhibice a indukce cytochromu P450

Koncentrace cytochromu P450 v organismu je podmíněna genetickými dispozicemi, regulována hormony a cytokiny a ovlivněna životním prostředím. Právě v životním prostředí se mohou vyskytovat látky, které ovlivňují koncentraci cytochromu P450.

Inhibice enzymu může být způsobena vazbou jiné látky než substrátu – inhibitoru na hem či protein. Tato vazba může být pouze dočasná nebo se jím může enzym trvale poškodit. Při reverzibilní inhibici se může jednat o kompetitivní inhibici, kdy o aktivní místo enzymu soutěží enzym a inhibitor. Nebo se inhibitor může navázat na komplex enzym-substrát, čímž ho inaktivuje.

Z hlediska indukce se cytochromy P450 dělí na konstitutivní a inducibilní. Konstitutivní enzymy se v organismu vyskytují vždy v dané koncentraci, která je stabilní, na rozdíl od inducibilních cytochromů P450, jejichž koncentrace jsou závislé na výskytu induktoru. Indukci mohou způsobovat substráty, ale i další látky, které mohou být exogenního i endogenního původu. Indukce probíhá přes transkripční faktory, které jsou aktivovány příslušnými buněčnými receptory. Známý jsou tři receptory – receptor pro aromatické uhlovodíky »aryl hydrocarbon receptor« (AhR), receptor pro pregnan X »pregnane X receptor« (PXR) a receptor pro konstitutivní adrostan »constitutive androstane receptor« (CAR). Po navázání ligandu na receptor, putuje tento komplex do jádra, kde se váže na transkripční faktory a spouští transkripci příslušného enzymu.<sup>16</sup>

Tabulka 1: Přehled vybraných cytochromů P450 <sup>4, 11, 16, 17</sup>

CYP	Výskyt	Substrát	Induktor	Inhibitor
1A1	pľíce, játra, mozek, GIT, lymfocyty, srdce	PAH, tamoxifen, warfarin, steroidní hormony, nikotin, benzo[a]pyren	PCB, flavonoidy, PAH, dioxiny	cholecalciferol, retinol, flavonoidy,
1A2	játra	kofein, retinal, PAH, steroidní hormony	PAH, PCB, TCDD, Indol-3- karbinol, kouření	dopamin, serotonin, tryptofan, flavonoidy
1B1	kůže, mozek, srdce, pľíce, placenta, j�tra, ledviny, GIT, slezina	PAH, heterocyklick� aromatick� aminy,	PAH, dioxin	tamoxifen, hesperetin
2A6	j�tra	nikotin, kumarin	estradiol, fenobarbital	tryptamin
2B1/2	mozek	morfin	nikotin	
2B6	j�tra, srdce	ketamin, nikotin, toluen	rifampicin, fenobarbital	prostaglandin, retinov� kys.
2C	j�tra, ledviny, srdce	retinol, fosfatidylcholin, ibuprofen, testosteron	rifampicin, fenobarbital	cyklosporin A, dimethylsulfoxid, kanabidiol
2D6	játra, mozek, srdce	kodein, methadon		aceton
2E1	játra, pľíce, mozek, endotel, srdce, kostní dřeň	ethanol, nitrosaminy	ethanol, hladovění, kouření	pyridin, interferon
3A4/5	játra pľíce, GIT, ledviny, mozek, endotel, placenta, lymfocyty	aflatoxin B1, tamoxifen, testosteron, cyklosporin A,	antibiotika (rifampicin), steroidy, fenobarbital	interleukin, adrenalin
4A9/11	ledviny	mastn� kyseliny		
4F2/3	ledviny	benzen, deriváty arachidonov� kys.	retinov� kyselina	

GIT – gastrointestinální trakt; PAH – polycyklické aromatick  uhlovodíky; PCB – polychlorované bifenylly; TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin. Více informací o látkách, se kterými cytochrom P450 interaguje, lze nalézt zde <sup>17</sup>.

## 1.3 Chemoprevence rakoviny

V roce 2009 byla druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice po nemocích oběhové soustavy rakovina. Na vznik nádorů zemřelo v daném roce 26% všech zemřelých. Nejčastější je výskyt zhoubného nádoru průdušek a plic, tlustého střeva, slinivky, prsa, prostaty a žaludku.<sup>18</sup> Z tohoto důvodu se nejspíše vynakládá spousta úsilí na prevenci, diagnostiku a léčbu rakoviny.

Chemoprevenci rakoviny lze definovat jako předcházení vzniku tumorů díky podávání jedné nebo více chemických sloučenin, které mohou být ve formě léčiva či potravního doplňku nebo jako součást stravy.<sup>19</sup>

Chemopreventivní látky lze rozdělit na dvě skupiny podle mechanismu jejich působení, přestože u některých látek je tento mechanismus neznámý či nekompletní. Do první skupiny spadají látky eliminující efekt karcinogenů a do druhé skupiny látky působící na tumorové promotory.

První skupinu chemopreventivních látek, které působí na karcinogeny, lze ještě dále dělit:

- látky inhibující vznik karcinogenní formy z prokarcinogenu – Příkladem je kyselina askorbová, která snižuje vznik karcinogenních nitrosoaminů ze sekundárních aminů.
- blokátory – Zabraňují dosažení nebo reakci s cílovým místem. Toho lze dosáhnout inhibicí aktivace karcinogenu, detoxikací či vychytáváním karcinogenu.
- supresory – Tyto sloučeniny inhibují proces karcinogeneze po vystavení organismu karcinogenu, který by mohl vést ke vzniku rakoviny.<sup>20</sup>

S chemopreventivními látkami se člověk běžně setkává v rostlinné stravě (ovoce, zelenina). Z hlediska struktury a výskytu lze dělit chemopreventivní látky do několika skupin (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Rozdělení chemopreventivních látek podle struktury <sup>21</sup>

Strukturní skupina	Příklad	Výskyt
karotenoidy	$\beta$ -karoten, $\alpha$ -karoten, lutein, astaxanthin	mrkev, citrusy, červená paprika, rajče, losos
vitamíny	C (askorbová kyselina), E ( $\alpha$ -tokoferol), A (retinol)	citrusy, jahoda, ananas, brokolice, rajče, špenát, zelená paprika, salát, oříšky
polynenasycené mastné kyseliny	dokosahexaenová kyselina, $\alpha$ -linolová kyselina	rostlinné oleje (řepka, sója)
konjugovaná linolová kyselina	konjugovaná linolová kyselina	hovězí maso, sýr, mléko
organosulfáty	diallyl sulfid, N-acetylcystein	česnek, cibule
fenolické sloučeniny	flavonoidy	kůra, slupka a jádérka ovoce, zelený čaj, víno
kurkumin	kurkumin	šafrán
<i>d</i> -Limonen	<i>d</i> -Limonen	citrusy
deriváty chlorofylu	chlorofyl, chlorofylin	zelený pigment u vyšších rostlin (např. řasy)
deriváty chitinu	chitin, chitosin	houby, členovci, mořští bezobratlí
isothiokyanáty	polysacharidové polymery (N-acetyl-D-glukosamin)	vláknina
dehydroepidandrosteron	dehydroepidandrosteron	jeden z metabolitů chlesterolu produkováný nadledvinami
laktoferin	laktoferin	savčí mléko

Vzhledem k propagovaným prospěšným efektům roste konzumace chemopreventivních látek ve formě tzv. potravních doplňků. Nicméně vedle těchto blahodárných účinků se mohou vyskytnout i účinky vedlejší a škodlivé – vlastní toxicita, metabolická přeměna na cytotoxickou či mutagenní látku, interference endogenních metabolických pochodů, interakce s dalšími látkami pocházející ze stravy, životního prostředí nebo léků, indukce enzymů aktivujících karcinogeny a různé efekty na lidskou střevní mikroflóru.<sup>22</sup>

### 1.3.1 Chemoprevence a cytochrom P450

Vzhledem k tomu, že pocházejí z přírodních zdrojů, jsou chemopreventivní látky ve formě potravních doplňků, kde je koncentrace těchto fytochemikálií několikrát vyšší než ve stravě, obecně považované za bezpečné. To potvrzují i klinické testy. Avšak tyto testy jsou uspořádány velmi zjednodušeně, zaměřují se většinou pouze na toxicitu dané



látky a opomíjejí důležité okolnosti, které ovlivňují důsledek používání potravních doplňků člověkem v běžném životě. V úvahu se totiž nebere fakt, že chemopreventivní látky v těle reagují i s dalšími sloučeninami (léčiva, enzymy atd.), čímž se navzájem ovlivňují. Jelikož cytochrom P450 je klíčový enzym metabolismu xenobiotik, hraje důležitou roli i v metabolismu chemopreventivních látek. Chemopreventivní látky totiž mohou cytochrom P450 indukovat nebo naopak inhibovat, což dále ovlivňuje metabolické pochody tímto enzymem katalyzované.

Bylo dokázáno, že některé chemopreventivní látky indukují expresi cytochromu P450, což vede i ke zvýšení jeho enzymové aktivity.<sup>23,24</sup> Dále je také známo, že zvýšená koncentrace některých cytochromů P450 souvisí s aktivací karcinogenů, které jsou přijímány v potravě či z okolního prostředí.<sup>22</sup> Aktivace spočívá v konverzi přijatých látek na elektrofilní metabolity, které se kovalentně váží na proteiny a DNA. Vzniklé adukty na DNA způsobují mutace, které mohou vyústit v rakovinu. Největší podíl na této bioaktivaci mají cytochromy P450 1A1, 1B1, 2A6, 2A13, 2E1 a pravděpodobně i 1A2, 2W1a 3A4. Příkladem může být mykotoxin, aflatoxin B<sub>1</sub>, jenž může být působením cytochromu 3A4 metabolizován na aflatoxin B<sub>1</sub> *exo*-8,9-epoxid, který se interkaluje mezi báze DNA. Jiný cytochrom P450, 2E1, je znám jako aktivátor molekul s nízkou molekulární hmotností. Dokladem je konverze ethylkarbamátu, jenž se může nacházet ve všech potravinách, které prošly procesem kvašení (chléb, jogurt, pivo či destiláty). Tato látka, známá také jako uretan, je cytochromem P450 2E1 přeměněna na epoxid tvořící adukty s bázemi adenosinu, guaninu a cytosinu.<sup>25</sup>

Naopak je také známo, že chemopreventivní látky mohou i inhibovat některé cytochromy P450 tím, že se přímo váží na tyto enzymy. Mnohé studie *in vitro* ukazují, že tím chrání DNA před vznikem aduktů.<sup>22</sup> Avšak touto inhibicí mohou vzniknout další problémy. Terfenadin, nesedativní antihistaminikum, je v organismu rychle oxidován na farmakologicky aktivní metabolit cytochromem 3A4. Pokud však je tento enzym inhibován jinými léčivy (ketokonazol, erythromycin) či stravou bohatou na grapefruit, dochází k hromadění terfenadinu v plazmě a srdci, což vede ke komorové polymorfní tachykardii a arytmií.<sup>25</sup> Jelikož cytochromy P450 jsou enzymy podílející se na metabolismu i endogenních látek, může mít jejich inhibice vliv na biosyntézu a funkci některých důležitých tělu vlastních látek. Flavonoidy blokují cytochrom P450 z rodiny 19, aromatasu. Aromatasa je klíčový enzym v biosyntéze estrogenů, katalyzující aromatizaci kruhu A androstendionu a testosteronu za vzniku estronu a estradiolu. Tyto

steroidní hormony jsou také odpovědné za proliferaci buněk. Takže inhibice jejich vzniku vede k hormonální nerovnováze končící až neplodností či ke zpomalení proliferace buněk.

## 1.4 Protilátky

Protilátky jsou jedním z hlavních nástrojů imunitního systému, který zajišťuje obranyschopnost organismu. Pokud se organismus dostane do styku s potenciálně nebezpečnou molekulou či organismem, začnou B-lymfocyty tvořit protilátky, které se na epitop daného antigenu váží s velkou afinitou a specifitou.<sup>26</sup> Díky těmto vlastnostem našly protilátky široké uplatnění ve vědě i lékařství. Využívají se zejména ke stanovení proteinů různými metodami (RIA, ELISA, Western blotting) a tudíž i při různých diagnostických testech (HIV test, stanovení rakovinových ukazatelů tzv. markerů). V lékařství se protilátky používají k pasivní imunizaci či neutralizaci toxinů.<sup>27</sup>

Pro vědecké účely se nejvíce používají králičí a myší protilátky. Ty jsou purifikovány z krve zvířete po imunizaci podáním antigenu. Podle postupu se dají získané protilátky dělit na:

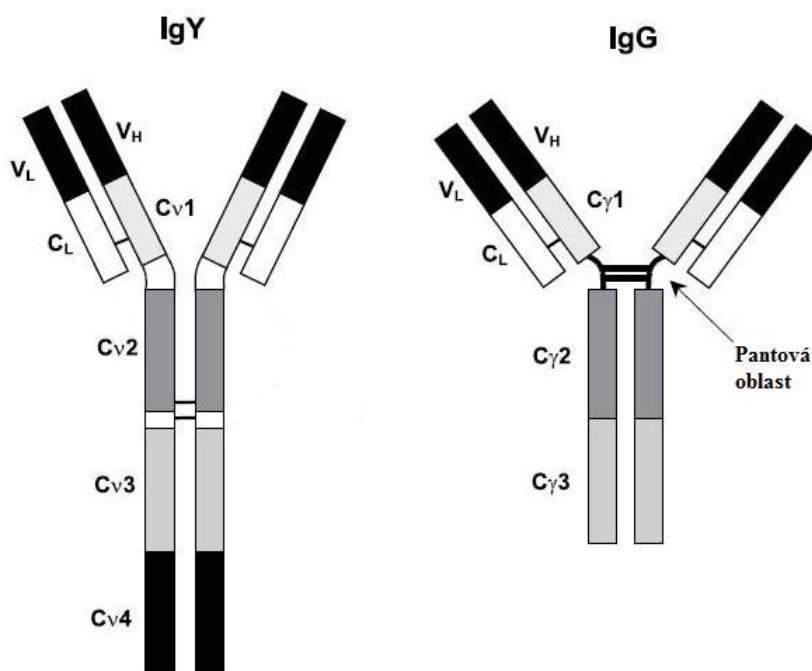
- polyklonální – Což je soubor protilátek, pocházejících z více různých klonů B-lymfocytů. Tyto protilátky se dokáží vázat na rozdílné epitopy antigenu. Příprava začíná imunizací, kdy je zvířeti podán antigen. Na něj reagují B-lymfocyty a vytvářejí na každý epitop velké množství protilátek, které se izolují z krve.
- monoklonální – Tento druh protilátek je produkován pouze klonem jediného B-lymfocytu, a tudíž mohou reagovat pouze s jedním epitopem antigenu. Jejich příprava začíná opět imunizací zvířete, po které následuje příprava hybridomu. Ten vzniká po sloučení buněk ze sleziny a myelomových buněk, jenž zajistí hybridomu neomezené dělení až nesmrtelnost. Dalším krokem je klonování hybridomů, které budou produkovat monoklonální protilátky.
- peptidové – Při přípravě peptidových protilátek se během imunizace podává zvířeti pouze krátký známý úsek proteinu – peptid. Vzniklé protilátky se poté váží na antigen v místě, kde se nachází aplikovaný peptid.<sup>28</sup>

### 1.4.1 Slepíčí protilátky

Slepíčí protilátky jsou získávány z vajec, do kterých byly před snesením transportovány z krevního oběhu slepice během latentní fáze.<sup>29</sup>

Ve vaječném bílku se nachází dva druhy protilátek-imunoglobulinů, IgM a IgA, které mají podobné vlastnosti a strukturu jako stejnojmenné protilátky u savců. Nicméně 75 % všech vaječných protilátek tvoří IgY nacházející se ve vaječném žloutku, které se původně označovaly jako IgG vzhledem k podobnosti se savčí IgG.<sup>29</sup> Později však bylo zjištěno, že mezi těmito protilátkami existují značné rozdíly, a proto se zvolilo nové označení IgY (z angl. yolk – žloutek).<sup>30</sup> Ve vaječném žloutku je koncentrace IgY dokonce 1,3-1,9× vyšší než v slepičím séru.<sup>31</sup>

### 1.4.2 Struktura IgY



Obrázek 3: Srovnání struktury slepičí protilátky IgY a savčí IgG (upraveno z <sup>32</sup>). V<sub>L</sub> – variabilní doména lehkého řetězce; V<sub>H</sub> – variabilní doména těžkého řetězce; C<sub>L</sub> – konstantní doména lehkého řetězce; Cv1-4 – konstantní domény těžkého řetězce IgY; Cγ1-3 – konstantní domény těžkého řetězce IgG

IgY se skládá ze dvou identických těžkých a dvou identických lehkých řetězců spojených disulfidickými můstky. Lehké řetězce obsahují jednu konstantní (C<sub>L</sub>) a jednu variabilní doménu (V<sub>L</sub>).<sup>29</sup>

Těžké řetězce IgY sestávají z jedné variabilní domény ( $V_H$ ) a čtyř konstantních ( $C\gamma 1-4$ ), což je rozdíl oproti savčí IgG (Obrázek 3). IgG obsahuje pouze tři konstantní domény ( $C\gamma 1-3$ ) a mezi doménou  $C\gamma 1$  a  $C\gamma 2$  se vyskytuje pantová oblast, která se pravděpodobně vyvinula z chybějící domény a díky níž má variabilní část IgG značnou pohyblivost. Srovnáním primárních struktur IgY a IgG se prokázala podobnost mezi  $C\gamma 3$  IgY a  $C\gamma 2$  IgG,  $C\gamma 4$  IgY a  $C\gamma 3$  IgG, což potvrzuje teorii o vzniku pantové oblasti. Další rozdíl mezi IgY a IgG spočívá v molekulové hmotnosti. Slepíčí protilátka IgY má molekulovou hmotnost 180 kDa oproti savčí protilátce IgG, jejíž molekulová hmotnost je 159 kDa. Také bylo zjištěno, že ve struktuře IgY se nalézá menší množství  $\beta$ -smyček než u IgG.<sup>32</sup>

Každá protilátka se dá rozštěpit na Fab a Fc fragment. Krystalizovatelný fragment Fc se skládá z konstantních domén a antigen vázající fragment Fab je složen z variabilních domén. I samostatný fragment Fab je schopen rozpoznat antigen a vázat jej.

### 1.4.3 Výhody slepičích protilátek

Nesporná výhoda slepičích protilátek ve srovnání se savčími protilátkami spočívá v neinvaznosti zákroku, který sestává pouze ze sbírání vajec. Naproti tomu se savčí protilátky získávají z krve zvířat (zejména králíků, myši, koz, prasat či koní). Krev je získávána častým odběrem, čímž je zvíře velmi stresováno, nebo srdeční punkcí, což má za následek smrt zvířete.<sup>27</sup> Péče o slepice je také méně finančně náročná.<sup>33</sup>

Jelikož se ve vaječném žloutku nachází pouze jediný druh protilátky, je snazší je izolovat.<sup>32</sup> Využívají se k tomu především metody precipitační, centrifugační, filtrační či extrakční.<sup>29</sup>

Ačkoliv by se nižší koncentrace IgY ve žloutku (10–25 mg/ml) než koncentrace IgG v savčím séru (pro králíka např. 35 mg/ml) mohla jevit jako nevýhoda, v dlouhodobém měřítku je tento fakt převážen množstvím snesených vajec. Stejně množství protilátek izolovaných z roční snůšky jedné slepice totiž odpovídá množství protilátek získaných ze séra až 30 králíků.<sup>27</sup>

Imunitní odpověď a tedy množství produkováných protilátek je také závislé na zdroji antigenu. Většinou platí, že imunitní odpověď se zvyšuje, když antigen pochází z organismu, který je fylogeneticky vzdálenější. Proto slepice produkují více protilátek na savčí proteiny než savci.<sup>34</sup> Tento fakt je důvodem k aplikaci menšího množství antigenu a snížení nutnosti opakované imunizace.<sup>35</sup> Vzhledem k evolučním rozdílům jsou také

slepičí protilátky schopné vázat se na větší množství epitopů savčích proteinů, a to až 3-5× více než savčí protilátky, čímž se výsledný signál amplifikuje a činí imunochemické metody citlivější.<sup>36</sup> Jelikož mají slepičí protilátky odlišné Fab oblasti, dovolují detekovat i takové epitopy, se kterými savčí protilátky nereagují.<sup>32</sup>

Další výhodou je fakt, že IgY nereaguje se savčím revmatoidním faktorem na rozdíl od IgG.<sup>37</sup> Revmatoidní faktor se vyskytuje zejména u pacientů trpících revmatoidní artritidou. Tato autoproti látka se váže na savčí IgG, a tím může v testech vyvolávat falešně pozitivní výsledky. Další falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny aktivací komplementového systému savců po reakci s cizí savčí IgG. Výsledky se pak mohou lišit až o 40%.<sup>36</sup> Tomuto problému se lze vyvarovat použitím slepičích protilátek, které komplementový systém neaktivují.

Tabulka 3: Srovnání vlastností IgY a IgG (převzato z <sup>38</sup>)

Zvíře	Králík (IgG)	Slepice (IgY)
Zdroj protilátek	Krevní sérum	Vaječný žloutek
Druh protilátek	Polyklonální	Polyklonální
Získání vzorku	Odběr krve	Sběr vajec
Množství protilátek	200 mg/40 ml krve	100±150 mg/vejce
Množství protilátek za rok	1 400 mg	40 000 mg
Podíl specifických protilátek	~5%	2 ± 10%
Interakce se savčím IgG	Ano	Ne
Interakce s revmatoidním faktorem	Ano	Ne
Interakce s proteinem A	Ano	Ne
Interakce s proteinem G	Ano	Ne
Aktivace savčího komplementového systému	Ano	Ne

## 2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo dokázat, že připravené protilátky izolované ze slepičích vajec jsou vhodné k detekci cytochromů P450.

Dílčím úkolem byla snaha o vylepšení této metody a porovnání několika možných způsobů imunodetekce cytochromů P450.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použitý materiál

**Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo**

dialyzační střevo typu 8/32, spony na střevo

**Fluka, Švýcarsko**

tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), tokoferol, dodecylsírán sodný (SDS), akrylamid, N,N'-methylenbisakrylamid (BIS), 2-merkapt ethanol

**Gentest corp., USA**

cytochrom P450 1A2

**KOCH-LIGHT LABORATORIES LTD., UK**

benzo[a]pyren

**Lachema/Lach-Ner, s. r. o., Česká republika**

KCl, HCl, methanol,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , glycerol,  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , vínán sodný,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , persírán amonný, bromfenolová modř, močovina, NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

**Millipore corp., USA**

Immobilon-P Transfer Membrane

**Penta, Česká republika**

NaOH, glycin, azid sodný ( $\text{NaN}_3$ )

**PML Protein. Mléko. Laktóza, a. s., Česká republika**

odtučněné mléko Laktino

**SERVA Electrophoresis GmbH, Německo**

N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R 250, Triton X-100

**Setuza a.s., Česká republika**

slunečnicový olej Vegetol

**Sigma-Aldrich Co., USA**

sodná sůl kyseliny bicinehonové,  $\beta$ -naphthoflavon, SigmaMarker Wide Range (6,5-200 kDa), králíčí protilátka IgG proti slepiší protilátce IgY konjugovaná alkalickou fosfatásou, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro-blue tetrazolium tablety (BCIP/NBT), keratin z lidské epidermis

**Thermo Scientific, USA**

Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa)

**Velaz s r.o., Česká republika**

samci potkanů druhu Wistar (140-150 g)

**Whatman, USA**

Whatman papíry 3

Protilátky získané ze slepičích vajec byly poskytnuty Prof. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.



## 3.2 Použité pomůcky a nástroje

### **Analytické váhy**

Discovery, Ohaus Corp., USA

### **Automatické pipety**

Nichipet EX, Nichiryo America, Inc., Japonsko; Proline Mechanical Pipette, Biohit, Finsko; Acura manual, Socorex, Švýcarsko

### **Centrifugy**

K23, Janetzki, Německo; K24, Janetzki, Německo; Optima LE-80K Ultracentrifuga, Beckman Coulter, USA

### **Čistička destilované vody**

Simplicity 185, Millipore corp., USA

### **Elektrický zdroj**

EPS 301 Power Supply, Amersham Biosciences Corp., USA

### **Elektroforetická aparatura**

MiniVE Vertical Electrophoresis System, Amersham Biosciences Corp., USA

### **Injekční mikrostříkačka**

MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton, Švýcarsko

### **Magnetické míchačky**

MM 2A, Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika; Monotherm Variomag, Německo

### **Mikrocentrifuga**

Spectrafuge Mini Centrifuge, Labnet International, Inc., USA

### **pH metr**

PerpHecT Digital Log Model 370, ATI Orion, USA

### **Předvážky**

KERN EW 600-2M, Kern & Sohn GmbH, Německo ;KERN EW440-35N, Kern & Sohn GmbH, Německo

### **SNAP systém detekce proteinů**

SNAP i.d.® Protein Detection System, Millipore corp., USA

**Sonikátory**

Elmasonic E30H Ultrasonic Cleaner, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Německo; UC 005 AJ1, Tesla, Česká republika

**Spektrometr**

SpektroMOM 195 D, MOM, Maďarsko

**Vodní lázeň**

TW8 Water Bath, JULABO Labortechnik GmbH, Německo

**Vortex**

VORTEX 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Německo

**Western blotting aparatura**

Fastblot B43, Biometra GmbH, Německo

## 3.3 Použité metody

### 3.3.1 Indukce potkanů

Samci potkanů druhu Wistar se nejprve po pět dnů aklimatizovali v Centru pro experimentální biomodely v Praze, Česká republika. Chováni byli v kovových klecích při 22 °C, kde se po 12 hodinách střídalo období dne a noci. Potkani měli stálý přístup k vodě a potravě. Zvířata byla rozdělena do několika skupin, kterým byly podávány různé dávky předpokládaných induktorů cytochromu P450:

- $\beta$ -naftoflavon: Potkanům byla podána jednorázová dávka  $\beta$ -naftoflavonu (60 mg/kg potkana) rozpuštěného v 1 ml slunečnicového oleje gavaží do žaludku. Po 48 hodinách od podání dávky byla zvířata usmrcena.
- Benzo[a]pyren: Benzo[a]pyren byl podán jako jednorázová dávka rozpuštěná v 1 ml slunečnicového oleje v koncentraci 150 mg/kg potkana gavaží do žaludku. Potkani byli po 24 hodinách zabiti.
- Kontrola: Kontrolní skupině potkanů byl gavaží do žaludku dán pouze 1 ml slunečnicového oleje a po 48 hodinách byla usmrcena.

### 3.3.2 Izolace mikrosomů

*Pufrr 1:* 0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; těsně před použitím bylo přidáno 23,5 mg tokoferolu v 0,5 ml methanolu/1 l pufru

*Pufrr 2:* 0,1 M  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /HCl; pH 7,2

*Pufrr 3:* 0,15 M KCl; 0,05 M Tris/HCl; 20% glycerol; pH 7,4

Mikrosomy byly získány z krysích jater pomocí centrifugačních metod.<sup>39</sup> Před použitím byla játra zmrazena při -80 °C a všechny pufry byly uchovávány při 4 °C. Při této teplotě také probíhal celý proces izolace.

Po zvážení byla játra rozstříhána a promyta v pufru 1. Následně byla tkáň homogenizována v Potter-Elvehjemově homogenizátoru ve čtyřnásobku pufru 1 hmotnosti jater. Tato suspenze byla centrifugována při 600 g po dobu 10 minut (centrifuga Janetzki K23, výkyvný rotor 4×70 ml, 2 000 RPM).

Supernatant byl odlit do kádinky a vzniklá sraženina byla opět homogenizována v Potter-Elvehjemově homogenizátoru v 1/4 původního objemu pufru 1. Následovala centrifugace za stejných podmínek jako předchozí.

Nově vzniklý supernatant byl oddělen od pelety a smíchán s prvním supernatantem. Veškerý supernatant byl centrifugován při 15 000 g po dobu 20 minut (centrifuga Janetzki K24, úhlový rotor 6×35 ml, 13 500 RPM). Po oddělení supernatantu a sraženiny byl supernatant ultracentrifugován 75 minut při 123 000 g (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti45, 6×64 ml, 35 000 RPM). Supernatant obsahující cytosol byl odlit a sraženina byla homogenizována v Potter-Elvehjemově homogenizátoru s dvojnásobným množstvím pufru 2 původních jater. Homogenizát byl ultracentrifugován při 425 000 g po dobu 75 minut (ultracentrifuga Beckman, úhlový rotor Ti45, 6×64 ml, 60 000 RPM).

Supernatant byl odstraněn a sraženina byla homogenizována v pětina pufru 3 hmotnosti původních tkání. Takto připravené mikrosomy byly rozděleny po cca 100 µl a uschovány při -80 °C.

### 3.3.3 Stanovení proteinů

*Činidlo 1:* 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,95%  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,16% vínan sodný; 0,4%  $\text{NaOH}$ ; 1% sodná sůl BCA

*Činidlo 2:* 4%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Výsledné reakční činidlo vzniklo smícháním činidel 1 a 2 v poměru 49:1.

Koncentrace proteinů byla stanovena Smithovou metodou.<sup>40</sup> Metoda využívá schopnosti proteinů redukovat  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$ , který je vizualizován reakcí s kyselinou bicinchoninovou (BCA) v alkalickém prostředí za vzniku fialového komplexu, jenž je měřen spektrofotometricky při 562 nm. Naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci proteinů.

Do sterilních zkumavek byly připraveny roztoky mikrosomů, slepého vzorku a standardu – hovězí sérový albumin (BSA). Mikrosomy z potkaních jater byly 50× naředěny MQ vodou a 10 µl tohoto roztoku bylo přidáno k 490 µl reakčního činidla. Slepý vzorek byl získán smícháním 20 µl MQ vody a 480 µl reakčního činidla. Ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 1 mg/ml byla ředěním připravena kalibrační řada – 2; 4; 10; 20 a 40 µg/ml.

Všechny roztoky byly pečlivě promíchány, zakryty alobalem a nechaly se inkubovat 60 minut ve vodní lázni při teplotě 60 °C.

Po ochlazení byla měřena absorbance standardů a vzorků při vlnové délce 562 nm oproti slepému vzorku.

Ze změřených absorbancí standardu byla sestrojena kalibrační křivka, jejíž regresní rovnice byla využita pro výpočet koncentrace bílkovin ve vzorku mikrosomů.

### 3.3.4 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

*gel A*

Pufr A: 0,375 M Tris/HCl; 0,1% SDS; pH 8,8

Polymerační roztok A v pufru A: 30% akrylamid; 0,8% BIS; pH 8,8

TEMED

100 mg/ml persíran amonný

*gel B*

Pufr B: 0,125 M Tris/HCl; 0,1% SDS; pH 6,8

Polymerační roztok B v pufru B: 30% akrylamid; 0,8% BIS; pH 6,8

TEMED

100 mg/ml persíran amonný

*Elektrodový pufr:* 0,025 M Tris/HCl; 0,195 M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3

*Vzorkový pufr redukující 4×koncentrovaný:* 0,25 M Tris /HCl; 8% SDS; 40% glycerol;  
20% 2-merkptoethanol; 0,003% bromfenolová modř;  
pH 6,8

*Barvicí lázeň:* 0,25% Coomassie brilliant blue R-250; 46% ethanol; 9,2% kyselina octová

*Odbarvovací lázeň:* 25% ethanol; 10% kyselina octová

Příprava gelů na 1 elektroforézu:

*8% Gel A:* 5,5 ml pufru A; 2 ml polymeračního roztoku A; 7,5 µl TEMED; 75 µl persíranu amonného

*3% Gel B:* 2,7 ml pufru A; 300 µl polymeračního roztoku A; 3 µl TEMED; 60 µl persíranu amonného

Elektroforéza slouží k rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti a náboje. U SDS elektroforézy v polyakrylovém poli (PAGE)<sup>41</sup> se využívá schopnosti dodecylsíranu sodného (SDS) udělit všem proteinovým makromolekulám stejně velký záporný náboj, a tudíž se v elektrickém poli pohybují pouze podle své molekulové hmotnosti.

Mezi dvě skla (10×10,5 cm) byly na okraje vloženy »spacery« a poté byla vložena do aparatury. Roztok pro polymeraci 8% separačního gelu A byl mezi ně nanášen pomocí pipety cca 4 cm od horního okraje, poté byl převrstven destilovanou vodou a nechal se zpolymerovat při pokojové teplotě. Po 45 minutách byla destilovaná voda odstraněna, skla byla vysušena filtračním papírem a na separační gel A byl aplikován roztok pro 3% zaostřovací gel B, do kterého byl vnořen hřeben s 10 zuby. Po uplynutí 20 minut byl gel B zpolymerizovaný, proto byl do komory nalit elektrodový pufr a hřeben byl vyjmut.

Do jamek byly nanášeny vzorky mikrosomů, cytochromu P450 připraveného v bakulosomech a standardu molekulových hmotností – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder nebo SigmaMarker Wide Range. Cytochrom P450 byly naředěny 41× do celkového objemu (objem MQ vody+vzorkového pufru). Vzorky mikrosomů byly ředěny na koncentraci bílkoviny 1 mg/ml. K takto zředěným roztokům byl přidán vzorkovací pufr v poměru 3:1. Všechny vzorky byly umístěny 5 minut ve vroucí vodní lázni (kromě Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder). Na elektroforézu bylo nanášeno 25 µl vzorků mikrosomů, 12 µl cytochromu P450 a 7 µl standardu injekční mikrostříkačkou.

Aparatura byla umístěna do elektroforetické nádoby, která byla poté naplněna elektrodovým pufrem. Na nádobu bylo nasazeno víko a aparatura se připojila ke zdroji. Nejprve probíhala elektroforéza při 80 V a po 30 minutách bylo napětí zvýšeno na 130 V. Elektroforéza byla ukončena, když čelo bromfenolové modři dosáhlo 0,5 cm od konců skel, tj. po dalších cca 90 minutách.

Po rozebrání aparatury a skel byl gel ponořen na 60 minut do barvicí lázně. Následné odbarvování bylo prováděno přes noc. Gel, který nebyl barven, byl využit na Western blotting.

### 3.3.5 Western blotting

*Přenosový pufr:* 0,025 M Tris; 0,192 M glycín; pH 8,3

*PBS Triton X-100:* 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3% Triton X-100; pH 7,2;

*Blokovací roztok:* 5% roztok odtučněného mléka v PBS Triton X-100

Z gelu byly rozdělené proteiny přeneseny metodou elektropřenosu na PVDF membránu, kde byly cytochromy P450 detekovány pomocí slepičí protilátky. Na membráně lze pozorovat množství proteinu v různých vzorcích.<sup>42</sup>

Gel byl ponořen na 10 minut do 10% roztoku methanolu v přenosovém pufru.

Mezitím byla podle rozměrů gelů ustříhnuta PVDF membrána a papíry Whatman 3. Tři papíry Whatman 3 byly navlhčeny v přenosovém pufru a položeny na anodu. Membrána byla vložena na 10 sekund do methanolu, poté do destilované vody a nakonec do přenosového pufru. Tato membrána byla položena na papíry Whatman 3 již umístěné na anodě. Na ní byl umístěn gel, který byl opět převrstven třemi papíry Whatman 3 namočenými v přenosovém pufru. Takto poskládaný sendvič byl k sobě důkladně přitisknut skleněnou tyčinkou, aby se vytlačily případné vzduchové bubliny mezi membránou a gelem.

Po přiklopení víka s katodou byl nastaven proud podle rozměrů gelů: 3,5 mA na cm<sup>2</sup>. Po 50 minutách byl přenos ukončen a membrána byla přes noc uložena v 5% odtučněném mléku při 4 °C, aby se zablokovala místa, na které se nepřenesly proteiny z gelu, a předešlo se tak nespecifickým reakcím.

Membrány byly rozstříhány a každá vložena do jinak upravené primární peptidové slepičí protilátky proti cytochromu P450 1A2 o koncentraci 15 µg/ml nebo proti 1A1/2 o koncentraci 30 µg/ml. Inkubace probíhala za laboratorní teploty 2 hodiny za stálého míchání na třepačce.

Na inkubaci se sekundární králičí protilátkou značenou alkalickou fosfatásou byly použity dvě metody jednak běžná inkubace, jednak nová metoda pomocí přístroje SNAP i.d.® Protein Detection System.

Některé membrány byly po dvouhodinové inkubaci s primární protilátkou třikrát promyty blokovacím roztokem vždy po 5 minutách. Poté byla aplikována sekundární protilátka – králičí IgG proti slepičí IgY konjugovaná alkalickou fosfatásou, která vznikla ředěním s blokovacím roztokem v poměru 1:1 430. Následovalo další promývání: 3×5

minut blokovacím roztokem, 2×5 minut PBS Triton X-100 a 2×5 minut MQ vodou. Nakonec byla membrána vyvolána v roztoku vzniklém rozpuštěním tablety BCIP/NBT v 10 ml vody. Po dostatečném zvýraznění byla reakce zastavena v destilované vodě a membrány byly usušeny mezi filtračními papíry.

Při druhém způsobu za použití SNAP i.d.® Protein Detection System (Obrázek 4) byly na navlhčené »spacery« komor MQ vodou přiloženy membrány proteinovou stranou. Komory byly uzavřeny a vloženy do přístroje, ke kterému byla připojena vývěva. Po zapnutí vývěvy a Snap byly membrány třikrát promyty doporučeným množstvím PBS Triton-X 100 a poté byly 10 minut inkubovány s roztokem sekundární protilátky, která byla připravena zředěním pufrům PBS Triton X-100 v poměru 1:1 430. Nakonec byly membrány opět promyty třikrát PBS Triton X-100. Pro vybarvení proužků se postupovalo stejně jako v předchozím případě.



Obrázek 4: SNAP i.d.® Protein Detection System<sup>43</sup>



### 3.3.6 Optimalizace metody

Během elektroforézy a Western blottingu dochází ke kontaminaci, která zapříčiní objevení se nežádoucích rozmazaných proužků na membráně. Tento nežádoucí jev je většinou způsoben keratinem, který pochází z lidské kůže a často kontaminuje chemikálie používané při elektroforéze. K odstranění tohoto defektu bylo navrženo několik postupů.<sup>44,45,46</sup> Jako nejsnadnější a nejlevnější se jevila metoda, kdy je k primární protilátce přidán keratin, čímž se protilátka vysytí a později na membráně s keratinem již nereaguje.<sup>47</sup> Proto se k primární protilátce přidávala keratinizovaná kůže (obroušená z paty) a keratin z lidské epidermis (od firmy Sigma-Aldrich).

Části primárních slepičích protilátek proti potkanímu cytochromu 1A1/2 (o koncentraci 29 mg/ml) a 1A2 (o koncentraci 30 mg/ml) byly inkubovány s keratinizovanou kůží. Do 500 µl protilátky bylo přidáno cca 50 mg keratinizované kůže a za občasného promíchání byla suspenze uchovávána dva dny při 4 °C. Poté byl roztok krátce centrifugován při 2 000 g (mikrocentrifuga Spectrafuge Mini Centrifuge, úhlový rotor 6×1,5/2,0 ml, 6 000 RPM) a vysycený roztok protilátky byl odsán. Stejně byla vysycena i kontrolní protilátka 1A1/2.

Další část primární protilátky byla sycena roztokem keratinu z lidské epidermis. Roztok primární protilátky a roztok keratinu byl smísen v poměru 5:1. Po promíchání byl výsledný roztok inkubován při 4 °C po dobu dvou dnů.

Poslední část protilátky zůstala nevysycena.

### 3.3.7 Dialýza keratinu

*Vzorek keratinu:* 1 mg keratinu v 110 µl roztoku 8 M močoviny; 50 mM Tris; 0,1 M 2-merkaptoethanolu; 0,1% NaN<sub>3</sub>; pH 8,4

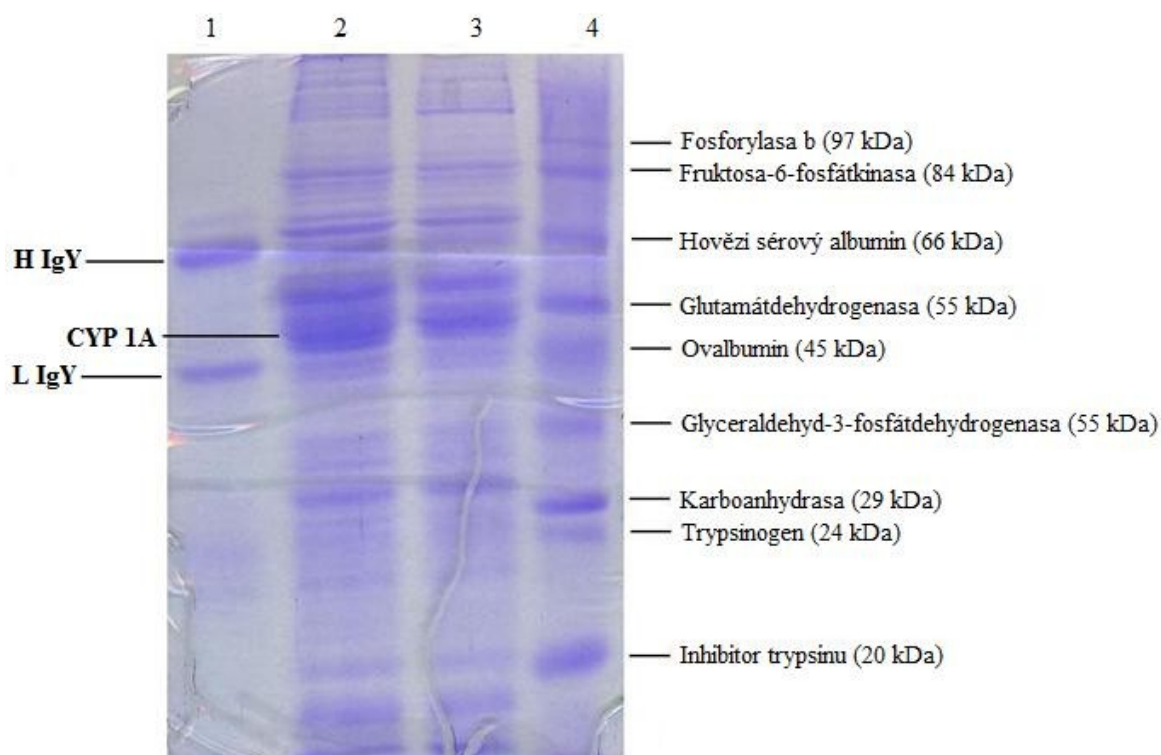
*Dialyzační pufr:* 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% NaN<sub>3</sub>; pH 7,2

K odstranění močoviny, která by mohla s 2-merkaptoethanolem denaturovat slepičí protilátky, čímž by rušila stanovení, byla použita dialýza. Touto metodou se přes polopropustnou membránu odstraní nízkomolekulární látky, zatímco makromolekuly zůstávají v roztoku před membránou.

Dialyzační střevo bylo na jednom konci uzavřeno sponou a druhým otvorem byl nanesen roztok keratinu (110  $\mu$ l). Skleněná nádoba od keratinu byla 2×vymyta 150  $\mu$ l PBS s 0,1%  $\text{NaN}_3$  a ještě 1×100  $\mu$ l téhož pufru. Poté byl druhý konec uzavřen sponou. Jako dialyzační roztok sloužil pufr PBS s 0,1% azidem sodným. Dialýza proběhla ve třech krocích po minimálně 6 hodinách za neustálého míchání. Během každého kroku byl použit 1 l pufru.

## 4 Výsledky

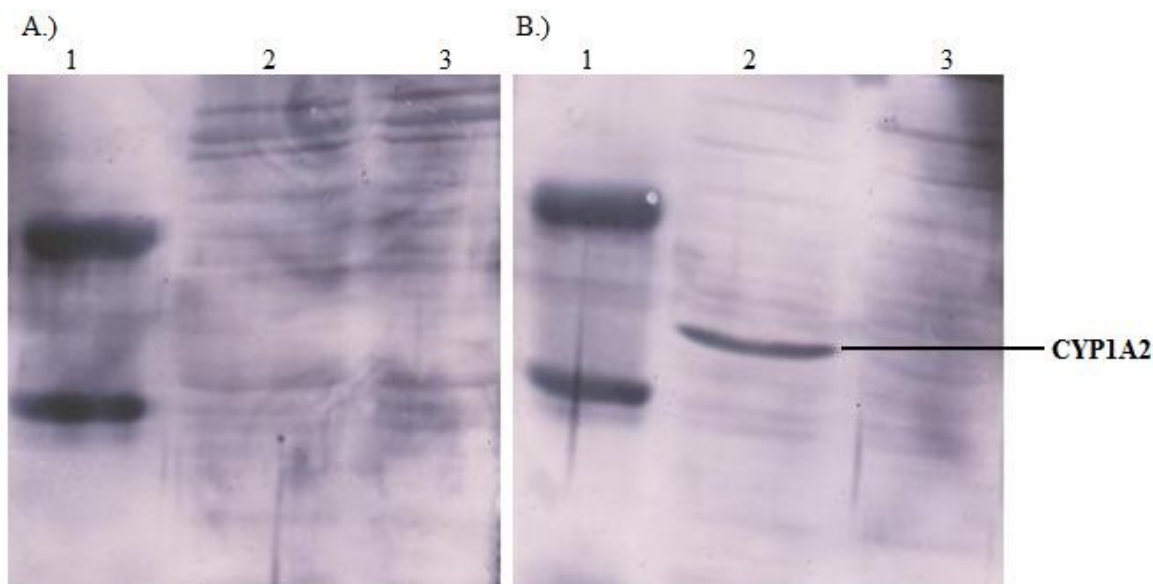
Nejprve bylo zjišťováno, zda připravená slepičí protilátka dokáže sloužit jako nástroj imunodetekce cytochromu P450. Na elektroforézu byla nanášena kontrolní slepičí protilátka jako pozitivní kontrola. Ta se rozdělila na lehké a těžké řetězce. Dále se na elektroforéze a membráně nalézají potkaní jaterní mikrosomy obsahující cytochrom P450 1A2 – kontrolní a indukovaný benzo[a]pyrenem. Cytochrom P450 z rodiny 1 byl identifikován pomocí srovnání se standardem molekulových hmotností, neboť se po rozdělení SDS elektroforézou nachází kolem molekulové hmotnosti 55 kDa (viz Obrázek 5). Poté byly dvě membrány se stejným obsahem inkubovány ve dvou různých primárních protilátkách – kontrolní a protilátce proti CYP1A2 (viz Obrázek 6), kde je zřetelně vidět proužek CYP1A2. Obě protilátky byly před použitím vysyceny keratinizovanou kůží.



Obrázek 5: Elektroforéza slepičí protilátky, krysích jaterních mikrosomů potkanů a standardu molekulové hmotnosti.

Dávkované vzorky: 1: 50 µg kontrolní slepičí protilátky; 2: 20 µg kontrolních jaterních mikrosomů z potkanů; 3: 20 µg jaterních mikrosomů z potkanů, kterým byl podán benzo[a]pyren; 4: 7 µl standardu molekulových hmotností SigmaMarker Wide Range.

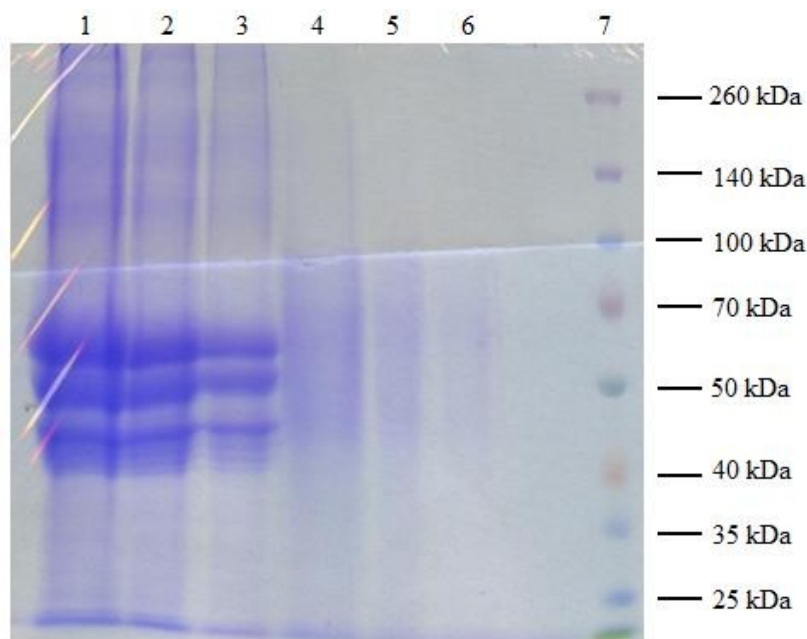
H IgY – těžké řetězce kontrolní protilátky; L IgY – lehké řetězce kontrolní protilátky; CYP 1A – cytochromy z rodiny 1



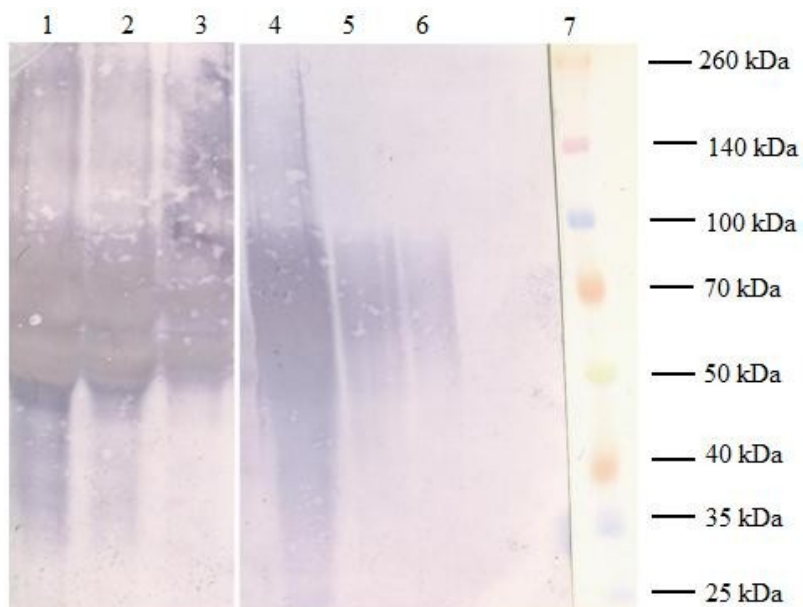
Obrázek 6: Porovnání membrán značených slepičí kontrolní protilátkou (A.) a specifickou protilátkou proti CYP1A2 (B.).

Dávované vzorky: 1: 50  $\mu\text{g}$  kontrolní slepičí protilátky; 2: 20  $\mu\text{g}$  kontrolních jaterních mikrosomů z potkanů; 3: 20  $\mu\text{g}$  jaterních mikrosomů z potkanů, kterým byl podán benzo[a]pyren. Membrány byly vyvolány v primární slepičí protilátce proti CYP1A2 o koncentraci 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a následně v sekundární králičí protilátce proti slepičí protilátce konjugované alkalickou fosfátou zředěné v poměru 1:1 430. Vyvolání bylo provedeno pomocí tablety BCIP/NBT.

Dále bylo zkoumáno, zda slepičí protilátka reaguje s keratinem a může tím vyvolat nežádanou kontaminaci. Proto byla provedena elektroforéza (viz Obrázek 7) a následně Western blotting (viz Obrázek 8) s různě naředěnými výluhy s keratinizované kůže (cca 100 mg/ml) a přesně definovaného preparátu keratinu z lidské epidermis v 8 M močovíně; 0,1 M  $\beta$ -merkaptoethanolu. Použitá protilátka (proti cytochromu P450 1A2) nebyla vysycena keratinizovanou kůží. Na Obrázku 7 je patrné, že keratin může interferovat při stanovení proteinů mající molekulovou hmotnost 50-100 kDa. Jelikož se zóna cytochromu P450 nalézá kolem oblasti 55 kDa, je keratin potenciální kontaminací.



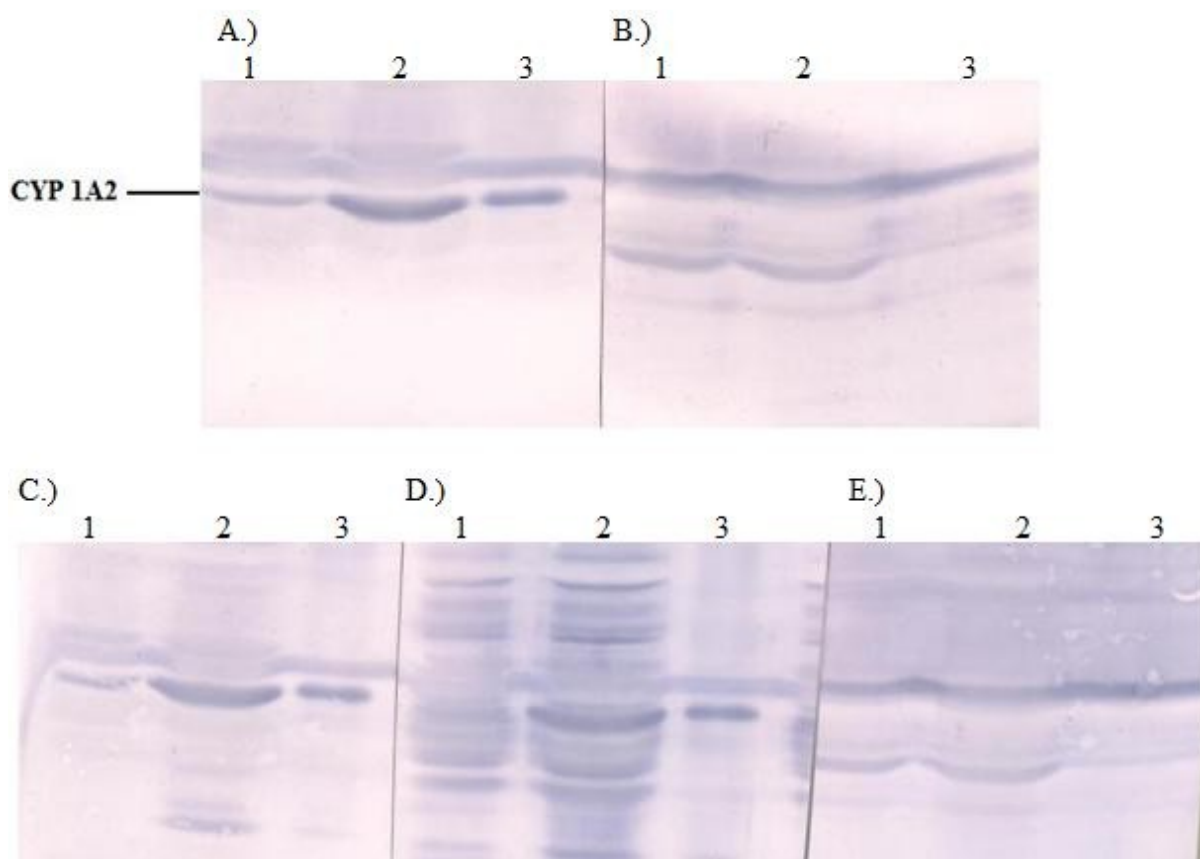
Obrázek 7: Elektroforéza keratinizované kůže a keratinu z lidské epidermis.  
Dávkované vzorky: 1: neředěný roztok keratinizované kůže; 2: 2× ředěný roztok keratinizované kůže, 3: 4× ředěný roztok keratinizované kůže, 4: 25 µg keratinu z lidské epidermis, 5: 5 µg keratinu z lidské epidermis, 6: 0,5 µg keratinu z lidské epidermis, 7: 7 µl Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.



Obrázek 8: Western blotting keratinizované kůže a keratinu z lidské epidermis.  
Dávkované vzorky: 1: neředěný roztok keratinizované kůže; 2: 2× ředěný roztok keratinizované kůže, 3: 4× ředěný roztok keratinizované kůže, 4: 25 µg keratinu z lidské epidermis, 5: 5 µg keratinu z lidské epidermis, 6: 0,5 µg keratinu z lidské epidermis, 7: 7 µl Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder.

Membrány byly vyvolány v primární slepičí protilátce proti CYP1A2 o koncentraci 15 µg/ml a následně v sekundární králičí protilátce proti slepičí protilátce konjugované alkalickou fosfatou zředěné v poměru 1:1 430. Vyvolání bylo provedeno pomocí tablety BCIP/NBT.

Další experiment spočíval v odstranění nežádoucích pruhů keratinového původu. Primární slepičí protilátka proti cytochromu P450 1A2 byla vysycena jednak keratinizovanou kůží, jednak dialysovaným roztokem přesně definovaného preparátu keratinu z lidské epidermis. Keratinizovanou kůží byla sycena i kontrolní protilátka. Z porovnání jednotlivých experimentů na Obrázku 9 je patrné, že interferující zóna (nad CYP1A2) nebyla vysycením protilátek odstraněna.



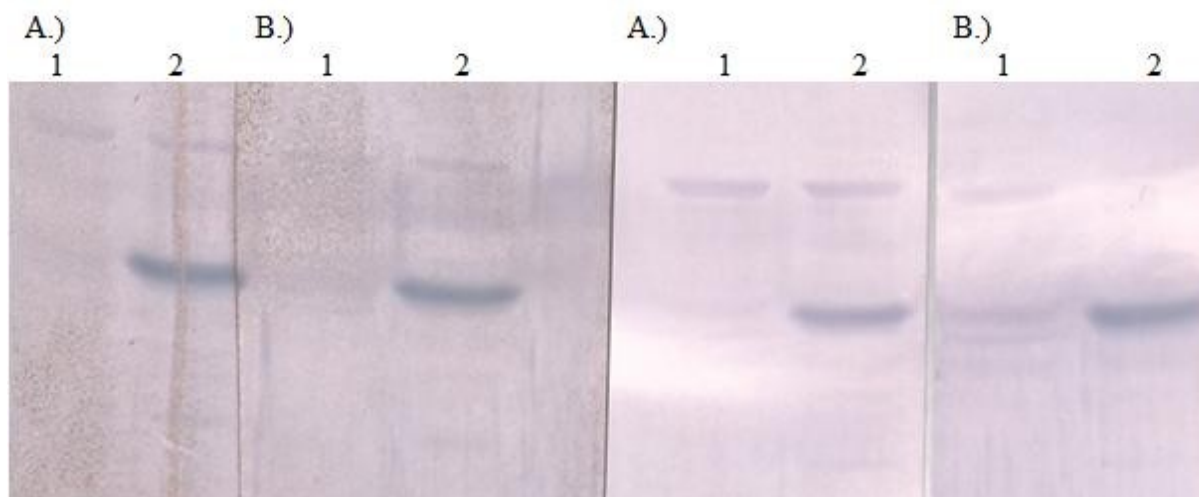
Obrázek 9: Porovnání membrán značených vysycenou a nevysycenou primární protilátkou.

Primární slepičí protilátky byly upraveny A.) nevysycená protilátka proti CYP1A2; B.) nevysycená kontrolní protilátka; C.) protilátka proti CYP1A2 vysycená keratinizovanou kůží; D.) protilátka proti CYP 1A2 vysycená keratinem z lidské epidermis; E.) kontrolní protilátka vysycená keratinizovanou kůží.

Dávkované vzorky 1: 20  $\mu$ g jaterních mikrosomů z potkanů, kterým byl podán  $\beta$ -naftoflavon; 2: 20  $\mu$ g jaterních mikrosomů z potkanů, kterým byl podán benzo[a]pyren; 3: 12  $\mu$ l CYP1A2.

Membrány byly vyvolány v různě upravených primárních slepičích protilátkách proti CYP1A2 o koncentraci 15  $\mu$ g/ml a následně v sekundární králičí protilátce proti slepičí protilátce konjugované alkalickou fosfátasou zředěné v poměru 1:1 430. Vyvolání bylo provedeno pomocí tablety BCIP/NBT.

Dále byl efekt vysycení protilátek keratinem sledován s protilátkou proti cytochromu P450 1A1/2 a to ve dvou provedeních. Prvé bylo klasické, zatímco ve druhém byl během inkubace se sekundární protilátkou zkoušen nový přístroj SNAP i.d.® Protein Detection System. Z Obrázku 10 je vidět, že použití jiné protilátky (proti cytochromu P450 1A1/2) ani způsob inkubace sekundární protilátkou nemá na konečný výsledek téměř žádný vliv.



Obrázek 10: Porovnání inkubace se sekundární protilátkou běžným způsobem (vlevo) a ve SNAP přístroji (vpravo).

Primární slepičí protilátky byly upraveny A.) nevysycená protilátka proti CYP1A1/2; B.) protilátka proti CYP1A1/2 vysycená keratinizovanou kůží.

Dávkové vzorky: 1: 20 µg kontrolních jaterních mikrosomů z potkanů; 2: 20 µg jaterních mikrosomů z potkanů, kterým byl podán β-naftoflavon.

Membrány byly vyvolány v primární slepičí protilátce proti CYP1A1/2 o koncentraci 30 µg/ml a následně v sekundární králičí protilátce proti slepičí protilátce konjugované alkalickou fosfátou zředěné v poměru 1:1 430. Vyvolání bylo provedeno pomocí tablety BCIP/NBT.

## 5 Diskuze

Cytochromy P450 jsou velmi důležité enzymy, které katalyzují metabolické přeměny exogenních i endogenních látek. S těmito enzymy interaguje značný počet sloučenin, mezi které patří i dnes velmi propagované a populární chemopreventivní látky, u nichž se očekává ochranné působení před vznikem či rozšířením rakoviny. Nicméně se ukazuje, že tyto látky mohou mít i efekt opačný právě kvůli svému působení na cytochromy P450. Chemopreventivní látky totiž mohou způsobit indukci cytochromů P450, což vede ke zvýšení jejich katalytické aktivity a možné aktivaci karcinogenů. Z tohoto důvodu je důležité mít k dispozici metody, které odhalí zvýšenou expresi cytochromu P450.

Tomuto účelu dobře slouží imunodetekce cytochromů P450 metodou Western blottingu. Cílový protein je detekován na membráně pomocí kombinace primární a sekundární protilátky s navázaným enzymem, který reakcí s chromogenním substrátem zbarví proteinovou zónu. Jako primární protilátky jsou dnes hojně využívané protilátky získané ze savců. Úkolem této práce bylo dokázat, že stejně dobře mohou fungovat i protilátky získané ze slepičích vajec, a tím i ukázat jejich výhody oproti např. králičím protilátkám.

Z výsledků je patrné, že primární slepičí protilátka dobře rozpoznávala cytochromy P450 1A1 a 1A2 na PVDF membráně. K ověření specifity protilátky proti cytochromu P450 1A2 byl na elektroforézu nanesen i vzorek cytochromu P450 1A2 připraven expresí v bakulosomech. Vyvolaný proužek příslušící cytochromu P450 1A2 jednoznačně prokázal specifitu testované protilátky.

Potkanům byl podáván potravní karcinogen benzo[a]pyren, který je známý a výrazný induktor CYP1 rodiny, a modelovaná chemopreventivní látka  $\beta$ -naftoflavon. Na membránách (viz Obrázek 9) si lze všimnout, že  $\beta$ -naftoflavon na rozdíl od benzo[a]pyrenu nenavodil výraznou indukci CYP1A2.

Při imunodetekci se na membránách mohou vyskytnout kontaminanty. Předpokládá se, že jsou často zapříčiněny keratinem, který je obsažen v lidské kůži, vlasech a nehtech. Během přípravy vzorků a elektroforézy tedy může dojít ke kontaminaci lidskými keratiny. Dále může být keratin přítomen v chemikáliích, zejména v 2-merkapt ethanolu, ve kterém se keratin výborně rozpouští. Slepice je schopna si vytvářet protilátky i na potravní antigeny, a protože je krmena masokostní moučkou obsahující nejčastěji hovězí keratin, vznikají proti této bílkovině protilátky. Při izolaci specifických protilátek



z vaječného žloutku obsahují získané polyklonální protilátky i protilátky proti keratinu. Obrázek 8 potvrzuje, že slepičí protilátky s keratinem na membráně reagují, což způsobuje čmouhy přibližně od 50 do 100 kDa. Protože toto je i oblast, ve které se nalézá cytochrom P450, je keratin potenciální kontaminantou, která interferuje při detekci zón cytochromů P450. Existuje více způsobů, jak předcházet vzniku pruhů keratinového původu, jako jsou např. afinitní chromatografie získaných protilátek, užití nižší koncentrace 2-merkptoethanolu<sup>45</sup>, použití vysoce čistých chemikálií.<sup>46</sup> Projev keratinové kontaminace lze však eliminovat i vysycením protilátek tímto proteinem. V této práci byla studována právě technika spočívající v přidavku keratinizované kůže k primární protilátce, čímž by se měly slepičí protilátky specifické na keratin vysytit, aby následně nereagovaly na membráně.<sup>47</sup> Nicméně srovnání ukázalo, že membrány inkubované s protilátkou původní a vysycenou keratinizovanou kůží dávají stejné výsledky. Z toho lze usuzovat, že práce byla provedena velmi čistě a že během elektroforetického dělení nedošlo ke styku s keratinem. Pravděpodobné je i to, že byly v průběhu celé práce použity čisté chemikálie. Naopak negativně se projevila snaha o eliminaci případné keratinové interference vysycením protilátky preparátem keratinu z lidské epidermis. Na membráně byly vidět další nespecifické a nežádané proužky, které bránily přesnému určení cytochromu P450, proto se tento způsob neprokázal jako vhodný.

Navíc byly v práci porovnány dva způsoby provedení metody Western blotting. Během inkubace se sekundární protilátkou byla použita jednak běžná inkubace, jednak inkubace za pomoci přístroje SNAP i.d.® Protein Detection System. Na Obrázku 10 lze pozorovat, že výsledné membrány jsou téměř totožné, což dokazuje, že obě techniky jsou stejně vhodné. Použití přístroje SNAP však metodu značně zrychluje a snižuje se množství potřebné sekundární protilátky i dalších chemikálií.

## 6 Závěr

Pomocí slepičích protilátek byly detekovány cytochromy P450 1A1 a 1A2, což dokazuje, že slepičí protilátky jsou vhodným nástrojem imunodetekce cytochromů P450.

Dále bylo prokázáno, že slepičí protilátky reagují s lidským keratinem, čímž mohou interferovat výsledky techniky Western blotting. Testované vysycení protilátek keratinizovanou kůží nevedlo k žádným změnám. Navíc použití vzorku keratinu z lidské epidermis způsobilo podstatné zhoršení kvality vyvolání membrán.

## Seznam použité literatury

1. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy* 2000, 94, 913-918.
2. Balíková M.: Forenzní a klinická toxikologie. Galen: Praha, 2007; p 21-33.
3. Nebert D. W., Russell D. W.: Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002, 360 (9340), 1155-62.
4. Stiborova M., Hudecek J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 1999, 93, 229-237.
5. Guengerich F. P.: Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 2001, 14 (6), 611-50.
6. Klingenberg M.: Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1958, 75 (2), 376-386.
7. Garfinkel D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1958, 77 (2), 493-509.
8. Omura T., Sato R.: A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 1962, 237, 1375-6.
9. Lu A. Y., Coon M. J.: Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 1968, 243 (6), 1331-2.
10. Kaschnitz R. M., Coon M. J.: Drug and fatty acid hydroxylation by solubilized human liver microsomal cytochrome P-450-phospholipid requirement. *Biochemical Pharmacology* 1975, 24 (2), 295-7.
11. Anzenbacher P., Anzenbacherova E.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2001, 58 (5-6), 737-47.
12. Ortiz de Montellano P. R.: Cytochrome P450. Structure, Function and Mechanism. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2005; p 1-3.
13. (a) Nebert D. W., Gonzalez F. J.: P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* 1987, 56, 945-93,(b) Nebert D. W., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., et al.: The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987, 6 (1), 1-11.
14. P450 Gene Superfamily Nomenclature Committee. <http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html> (cit. 4. 5. 2011).
15. Guengerich F. P.: Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2007, 21 (4), 163-8.
16. Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology* 2008, 82 (10), 667-715.

17. Rendic S.: Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* 2002, 34 (1-2), 83-448.
18. Český statistický úřad: Zemřelí podle seznamu příčin smrti, pohlaví a věku v ČR, krajích a okresech (2000 až 2009).  
[http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/kapitola/4017-10-%282000\\_az\\_2009%29-01](http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/kapitola/4017-10-%282000_az_2009%29-01) (cit. 16. 5. 2011).
19. Morse M. A., Stoner G. D.: Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 1993, 14 (9), 1737-46.
20. Wattenberg L. W.: Chemoprevention of cancer. *Cancer Research* 1985, 45 (1), 1-8.
21. Tsuda H., Ohshima Y., Nomoto H., Fujita K., Matsuda E., Iigo M., Takasuka N., Moore M. A.: Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2004, 19 (4), 245-63.
22. Hodek P., Krizkova J., Burdova K., Sulc M., Kizek R., Hudecek J., Stiborova M.: Chemopreventive compounds--view from the other side. *Chemico-biological Interactions* 2009, 180 (1), 1-9.
23. Krizkova J., Burdova K., Hudecek J., Stiborova M., Hodek P.: Induction of cytochromes P450 in small intestine by chemopreventive compounds. *Neuroendocrinology Letters* 2008, 29 (5), 717-21.
24. Desai P. B., Nallani S. C., Sane R. S., Moore L. B., Goodwin B. J., Buckley D. J., Buckley A. R.: Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Drug Metabolism and Disposition* 2002, 30 (5), 608-12.
25. Guengerich F. P.: Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 2008, 21 (1), 70-83.
26. Lipman N. S., Jackson L. R., Trudel L. J., Weis-Garcia F.: Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR Journal* 2005, 46 (3), 258-68.
27. Hodek P., Koblas T., Rýdlová H., Kubíčková B., Šulc M., Hudeček J., Stiborová M.: Chicken Egg Yolk as an Excellent Source of Highly Specific Antibodies Against Cytochromes P450. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 2004, 69 (3), 659-673.
28. Shou M., Lu A. Y. H.: Antibodies as a Probe in Cytochrome P450 Research. *Drug Metabolism and Disposition* 2009, 37 (5), 925-931.
29. Chalghoumi R., Beckers Y., Portetelle D., Théwis A.: Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 2009, 13 (2), 295-308.
30. Leslie G. A., Clem L. W.: Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *Journal of Experimental Medicine* 1969, 130 (6), 1337-52.

31. Hodek P., Stiborová M.: Chicken Antibodies – Superior Alternative for Conventional Immunoglobulins. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 2003, 4, 461-468.
32. Kovacs-Nolan J., Mine Y.: Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and Poultry Biology Reviews* 2004, 15, 25-46.
33. Schade R., Calzado E. G., Sarmiento R., Chacana P. A., Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H. R.: Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals* 2005, 33 (2), 129-54.
34. Dias da Silva W., Tambourgi D. V.: IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2010, 135 (3-4), 173-180.
35. Gassmann M., Thommes P., Weiser T., Hubscher U.: Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB Journal* 1990, 4 (8), 2528-32.
36. Carlander D., Stalberg J., Larsson A.: Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Upsala Journal of Medical Sciences* 1999, 104 (3), 179-89.
37. Larsson A., Karlsson-Parra A., Sjoquist J.: Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry* 1991, 37 (3), 411-4.
38. Michael A., Meenatchisundaram S., Parameswari G., Subbraj T., Selvakumaran R., Ramalingam S.: Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian Journal of Science and Technology* 2010, 3 (4), 468-474.
39. van der Hoeven T. A., Coon M. J.: Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 1974, 249 (19), 6302-10.
40. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985, 150 (1), 76-85.
41. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227 (5259), 680-5.
42. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979, 76 (9), 4350-4.
43. Overview of the SNAP i.d.® Protein Detection System. <http://www.millipore.com/catalogue/module/c73105#> (cit. 28. 5. 2011).
44. James T. L., Milos N. C.: Elimination of vertical streaking in polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 2007, 367 (1), 134-6.

45. Lee T. F., McNellis T. W.: Elimination of keratin artifact bands from western blots by using low concentrations of reducing agents. *Analytical Biochemistry* 2008, 382 (2), 141-3.
46. Paul-Pletzer K., Parness J.: Elimination of keratin contaminant from 2-mercaptoethanol. *Analytical Biochemistry* 2001, 289 (1), 98-9.
47. Berube B., Coutu L., Lefievre L., Begin S., Dupont H., Sullivan R.: The elimination of keratin artifacts in immunoblots probed with polyclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* 1994, 217 (2), 331-3.